

<https://helda.helsinki.fi>

APAC - ett nytt multifunktionellt antitrombotiskt agens med inriktning på kärlskada

Jouppila, Annukka

2020

Jouppila , A & Lassila , R 2020 , ' APAC - ett nytt multifunktionellt antitrombotiskt agens med inriktning på kärlskada ' , Finska Läkaresällskapets Handlingar , vol. 180 , nr. 1 , s. 58-64 . <
https://www.fl.s.fi/Site/Data/884/Files/2020/Handlingar%201-2020/1-2020/Handlingar-lehti_120_12.pdf
>

<http://hdl.handle.net/10138/324997>

publishedVersion

Downloaded from Helda, University of Helsinki institutional repository.

This is an electronic reprint of the original article.

This reprint may differ from the original in pagination and typographic detail.

Please cite the original version.

APAC – ett nytt multifunktionellt antitrombotiskt agens med inriktning på kärlskada

ANNUKKA JOUPPILA OCH RIITTA LASSILA

APAC (AntiPlatelet AntiCoagulant) är ett nytt halvsyntetiskt heparin-biokonjugat med både antitrombocyt- och antikoagulansverkan, som är modellerat efter naturligt förekommande heparin-proteoglykaner från mastceller. APAC-komplexet i sig är ett antikoagulant eftersom det hämmar trombin och koagulationsaktiveringen. När APAC binds till en bärare uppvisar det på samma gång också antitrombocytaktivitet genom att begränsa trombocyttaggregation som orsakas av kollagen, ristocetin och trombin. Dessutom försvagar APAC med brett spektrum koagulationsfrämjande aktiviteter vid trombos både *in vitro* och *in vivo*. APAC upprätthåller adenosindifosfatinducerad trombocyttaggregation, vilket ger en hemostatisk fördel. APAC ansamlar receptorer på trombocyternas yta och fäster dem vid den tyrosinkinashämmande trombocytreceptorn G6b-B, en mekanism som reglerar kollagenförmedlad trombocytaktivering. Dessutom samverkar APAC kraftigt med von Willebrandfaktorn och med skjuvkraftstinducerad tillväxt av trombor, vilket är viktigt i små kärl och artärer. När APAC appliceras antingen lokalt inne i en artär eller intravenöst i cirkulationen söker det sig till ställen med färsk kärlskada och ger lokal antitrombotisk effekt i gnagar-, svin- och primatmodeller. Dessa egenskaper minskar trombbildningen på interventionsställena, vilket tillåter låg dosering. En höjdpunkt är att APAC tillbakabildar skada efter ischemi och reperfusion i en akut njurskademodell och upprätthåller njurfunktionen. Det toxikologiska programmet har genomförts och de första kliniska prövningarna kommer snart att inledas. APAC kan komma att erbjuda ett användbart terapeutiskt verktyg, ensamt eller i kombination med andra antitrombotiska agens, för att förbättra behandlingseffekten och säkerheten vid olika kärlsjukdomar och vid kirurgi.

Inledning

Trombocyterna transporterar de läkande elementen till ett ställe med kärlskada, börjande med ett lager av trombocyter som fäster vid varandra och aggregerar, vilket säkerställer den primära hemostasen och den lokala koagulationsaktiviteten så att fibrin bildas och sårsläkningen kommer igång. Snabb och okontrollerad tillväxt av trombocyttromber

leder dock till tilltäppta kärl, ischemi och slutligen till nekros av vitala organ. Både det fysiologiska hemostatiska svaret på skada och den patologiska tillväxten av artärtrombor är beroende av von Willebrandfaktorn (vWF), trombocytaktivering och därmed sammanhängande signalering av vissa trombocytagonister, såsom kollagen och andra extravaskulära matrixproteiner och strukturer, och av molekyler förmedlade av blodceller.

Etablerade antitrombotiska behandlingar omfattar systemiska antitrombocytagens och antikoagulantia för behandling och förebyggande av arteriell eller venös tromboembolism, respektive (2). Acetylsalicylsyra i låg dos inhiberar cyklooxygenas 1 (COX-1) och minskar syntesen av trombocytaktivatorn tromboxan A₂, främst i trombocyter och röda blodkroppar. Oralt klopido­gre­l, prasugrel, tikagrelor eller intravenöst kangrelor verkar som antagonister mot adenosindifosfat (ADP),

SKRIBENTERNA

Annukka Jouppila^{1,2} och **Riitta Lassila**²⁻⁴

¹HUS Enheten för klinisk forskning, ²Forskningsprogrammet för systemonkologi Oncosys, Medicinska fakulteten, Helsingfors universitet, ³Enheten för koagulationsstörningar, linjen för hematologi, HUS Cancercentrum och ⁴Aplagon Oy, Helsingfors

vilket påverkar purinerga P₂Y₁₂-receptorer. Abciximab, eptifibatid och tirofiban inhiberar glykoproteinet (GP) IIb/IIIa i trombocyterna, men de används nu i mindre utsträckning för behandling av akut artärtrombos i ADP-signalväghämmarna och de kombinerade antikoagulantias tidevarv.

Vid sidan av antitrombocytbehandling omfattar den antitrombotiska behandlingen traditionella parenterala antikoagulantia, såsom ultrafraktionerat heparin (UFH) eller lågmolekylära hepariner (LMWH) (exempelvis dalteparin, enoxaparin och tinzaparin) samt fondaparinux, som mest inverkar på FXa. UFH:s effekt grundar sig på att förstärka aktiviteten av antitrombin som i lika hög grad inhiberar faktor Xa (FXa) och IIa (FIIa, trombin), bland andra koagulationsfaktorer (2). Målet för de orala vitamin K-antagonisternas (VKA) verkan är syntesen av FII, FVII, FIX och FX. De nyare måldrivna direkta orala antikoagulantia (DOAC), trombinhämmaren dabigatran samt FXa-hämmarna rivaroxaban, apixaban, edoxaban och betrixaban, håller på att ersätta VKA vid behandling av förmaksflimmer och venös tromboembolism (3). Deras gynnsamma effekt vid prevention och behandling av trombos är väl etablerad. Kombinerad systemisk användning av antitrombocytläkemedel och antikoagulantia ökar dock blödningsrisken, upp till 60–80 procent vid dubbelbehandling och 130 procent vid trippelbehandling (4). Säkerhetsfaktorer blir allt viktigare med en åldrande patientpopulation med samsjuklighet såsom njursvikt, kardiovaskulära och inflammatoriska sjukdomar, behov av akut kirurgi, och cancer, vilka alla ökar risken för blödningskomplikationer. I det optimala fallet är målet för den antitrombotiska aktiviteten enbart det skadade stället i ett blodkärl, där den är förenlig med fysiologisk hemostas. Detta gäller om den lokala vaskulära regleringen av koagulationen inte är störd eller saknas, vilket kan förekomma vid kraftig inflammation och/eller cancer. En lokal antitrombotisk strategi skulle därför vara till fördel för att minska risken för systemiska blödningar. En sådan strategi skulle också vara förenlig med den lokala hemostasprocessens fysiologi.

Kärlvävnadens adventitiallager innehåller mastceller som utsöndrar heparinproteoglykaner (Hep-PG) (5). Hep-PG har visats ta del lokalt i reparationen av blodkärl, och kontrollera koagulationen (6–8) på samma ställe där uttrycket av vävnadsfaktor (TF) i lokala glattmuskelceller är högt. Antigen i löslig form eller fäst på en yta hämmar Hep-

PG avlagringen av trombocyter på kollagen under blodflödesförhållanden, och minskar den trombotiska processen vid artäranastomoser (7, 8). Hep-PG minskar också proliferationen av vaskulära glattmuskelceller (9). De kliniskt använda heparinerna (UFH eller LMWH) isoleras i själva verket från PG-proteinstommen i tarmslemhinna från svin och nötkreatur. När heparinet binds till ett bärarprotein omvandlas APAC-konjugaten (antitrombocyt och antikoagulans) till dubbla antitrombocyt- och antikoagulansagens, med egenskaper som skiljer sig från lösligt heparin. Vi har använt oss av tidigare kunskap om Hep-PG för att utveckla en semisyntetisk mimet, APAC (Aplagon Oy, Helsingfors). Den har på ett unikt sätt både antitrombocyt- och antikoagulansegenskaper, den målsöker stället med kärlskada och den hämmar påtagligt trombos i flera djurmodeller av trombos och annat (11–14). Förutom intravenös användning kan APAC också administreras lokalt i låg dos i samband med vaskulära ingrepp, vilket minskar blödningsrisken jämfört med de systemiska antitrombotiska behandlingar som är i omfattande kliniskt bruk. De antitrombotiska egenskaper hos APAC som hittills kommit fram beskrivs i det följande.

Använda material och metoder

Vi refererar nu kort några grundläggande studier angående APAC:s verkningsmekanism (11–15).

In vitro

Studier gällande trombocyter och koagulation

Effekten av tillsatt APAC bedömdes vid trombocyttaggregation inducerad av kollagen, ristocetin och ADP i trombocytrik plasma (PRP), och dessutom i PRP behandlad med apixabancitrat enligt Borns metod samt i citrat- eller hirudinblod med Multiplate®-analys (DiaPharma, West Chester, OH, USA) (11,15). Mobilisering av kalcium i trombocyter studerades i PRP med tillsats av apixaban (13). APAC:s antikoagulanstyrka mättes med partiell aktiverad tromboplastintid (APTT), trombintid (TT) och med anti-FIIa och anti-FXa-aktiviteter i citratplasma. Trombingenerering mättes med kalibrerat automatiserat trombogram (CAT®, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, Frankrike) både i plasma (5 pM TF, 4 µM fosfolipider) och i PRP (5 pM TF) (11). Den övergripande antikoagulationen

mättes i blod med rotationstromboelastometri (ROTEM®, TEM Innovations, München, Tyskland). Den antitrombotiska effekten av APAC i blod (som antikoagulerats med trombinhämmaren DPhe-Pro-Arg-klorometylketon, FXII-hämmaren corn trypsin inhibitor eller med enbart APAC) bedömdes i en kammar belagd med kollagen/TF under venösa (200 s^{-1}) eller arteriella (1000 s^{-1}) flödesförhållanden (13). Effekten av APAC på den trombocyt- och megakaryocyt-specifika receptorn G6b-b undersöktes i tvättade humana trombocyter med trombocytsignaleringsanalys av fosforylering via tyrosinfosfataser (15). Mustrombocyter, dels av vildtyp, dels med G6b-Bbrist, studerades i flödescytometristudier i blod med APAC genom aktivering och degranulering av integrin- $\alpha\text{IIb}\beta 3$ i trombocyter, som förmedlas av receptorn CLEC-2 (C-type lectinlike receptor 2) i trombocyter.

In vivo

APAC:s antitrombotiska effekter

Den antitrombotiska effekten av lokalt APAC *in vivo* studerades med två modeller av akut trombos hos babianer. I den modifierade Folts-modellen observerades effekten av APAC på artärförträngning på ett krosskadat och förträngt ställe i arteria femoralis. I den andra modellen studerades aggregationen av trombocyter ($^{11}\text{indium}$) och bildningen av fibrin ($^{125}\text{jod-fibrinogen}$) under blodskjuvkraften 265 s^{-1} på ett extrakorporealt kollagenbelagt preparat som förbehandlats med APAC (11). Dessutom studerades intravenöst (iv) APAC vid fotokemiskt (rose bengal-färg) inducerad laserskada på arteria carotis hos möss, där ocklusion av kärlet upptäcktes genom flöde (Bonetti *et al.*, *inlämnad*). I en annan musmodell av kollageninducerad trombos fördes en inverterad a. epigastrica i a. carotis för att åstadkomma en mycket trombogen yta. Aggregation av rodamin-G-märkta trombocyter och fluoroforkopplat APAC upptäcktes. Antikoagulationseffekten av APAC *in vivo* studerades med svansblödningstid hos råttor (11).

APAC:s vaskulärt målsökande effekter

APAC:s vaskulära målsökning studerades med flera modeller av artärskada. Hos råttor applicerades ^{64}Cu -märkt APAC lokalt på adventitia- eller intimasidan av en anastomos på a. femoralis i bakbenet, och den lokala ansamlingen följdes upp med positronemissionstomografi (PET) (11,12). Hos svin ut-

fördes analys med immunfluorescens och immunhistokemi *ex vivo* på kirurgiskt anlagd arteriovenös fistel (AVF) mellan a. och v. femoralis och på a. iliaca och a. carotis som avskalats med ballongkateter (14). Biotinylera APAC applicerades lokalt på skadestället i två minuter, och sedan återställdes blodcirkulationen i 30 minuter. Det aktuella kärlområdet resekterades och postfixerades för histologisk bedömning.

APAC:s njurskyddande effekter vid ischemi-reperfusionsskada

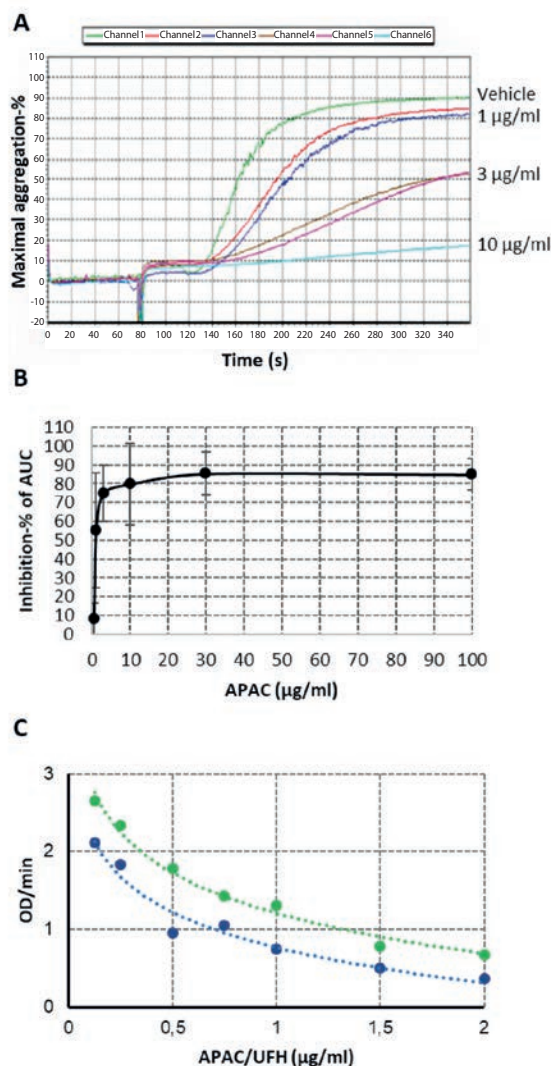
APAC:s njurskyddande effekter vid ischemi-reperfusionsskada (IRI) studerades på råttor (12). APAC gavs iv tio minuter innan varm ischemi började. Båda njurartärerna klämdes ihop i 30 eller 60 minuter. Efter att klämmarna tagits bort inspekterades njurarna med avseende på återupprättat blodflöde och tecken på inre blödningar, och buken slöts. Blodprov togs för bedömning av markörer för njurskada. Råttorna följdes upp i 72 timmar och avlivades sedan och njurarna togs till vara för histologisk undersökning.

Sammanställning av publicerade resultat

Effekterna av APAC *in vitro*

APAC (10 individuella satser) hämmade koncentrationsberoende ($1\text{--}100\text{ }\mu\text{g/ml}$) kollagen-inducerad trombocyttaggregation i citrerad PRP i relation till fosfatbuffrat koksaltlösning som vehikel (11, 13, 15), medan UFH inte gjorde det (11, 15). Inhiberingen av den sammanlagda aggregationen var donatorberoende (se figur 1, APAC:s effekt på maximal aggregation utlöst av $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ kollagen. ADP-inducerad PRP-aggregation påverkades varken av APAC eller av UFH (data visas inte). Vidare sågs att APAC ($100\text{--}200\text{ }\mu\text{g/ml}$) minskade kollagenutlöst (2mg/ml) trombocyttaggregation i PRP, när endogen trombingenerering blockerades med apixaban för att kontrollera blodproppsbildningen under undersökningen. I helblod minskade APAC ($150\text{ }\mu\text{g/ml}$; $n = 9$) kollagen- ($3,2\text{ }\mu\text{g/ml}$) och ristocetininducerad ($0,77\text{ mg/ml}$) trombocyttaggregation 1,8 respektive 2,8 gånger (11). ADP-inducerad ($6,4\text{ }\mu\text{M}$) aggregation hämmades varken av APAC eller av UFH.

APAC i låg dos (10 individuella satser) förlängde APTT och TT koncentrationsberoende ($0,5\text{--}4\text{ }\mu\text{g/ml}$) åtminstone 1,4 gånger över basnivåerna ($27\text{--}30\text{ s}$). Vid samma koncentration är anti-FIIa- och FXa-aktiviteten för APAC större



Figur 1. Exempel på APAC:s antitrombocyt- och antikoagulationseffekter *in vitro*. Koncentrationsberoende minskning av kollageninducerad (0,5 µg/ml) trombocyttaggregation med APAC i citrerad PRP från en donator som exempel (A), och som genomsnittshämning (\pm SD) av prover från 9 donatorer (B). APAC:s anti-IIa-aktivitet i OD/min (blått) och UFH (grönt) i citrerad plasma visas i C.

än för UFH (figur 1 C). APAC (5 individuella satsar) och UFH hämmade koncentrationsberoende (0,5–1 µg/ml) trombingenerering i både plasma och PRP (11). Redan vid 1 µg/ml hämmade dock APAC ($n=12$) trombinbildningen i plasma minst 30 procent kraftigare än UFH. I PRP upphävde APAC trombinet redan vid 1 µg/ml, medan trombinbildning fortfarande upptäcktes i närvaro av UFH. Vid helblodskoagulation med ROTEM förlängde APAC (3–10 µg/ml) extern (EXTEM) och intern (INTEM) koagulationstid åtminstone trefalt

över basnivån, medan UFH gav en förlängning till det dubbla. Trombens fasthetstid minskades vid båda tillstånden av APAC, vilket tyder på att APAC har effekt på trombocyternas bidrag till trombbildningen. Heparinas (HEPTEM) utplånade antikoagulationseffekten.

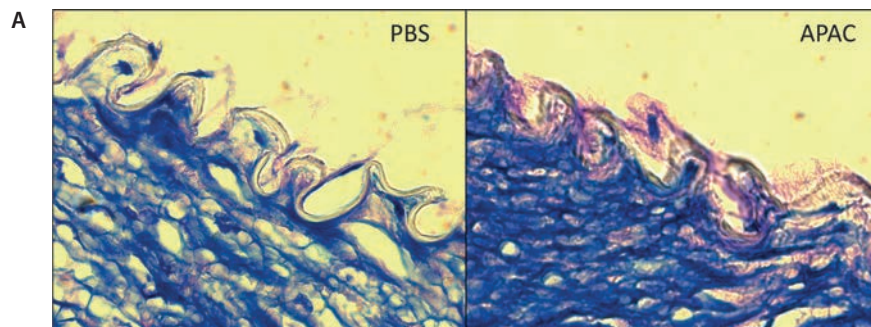
I PRP hämmade APAC-varianter (12,5 µg/ml; $n=3$) trombin- och kollagenberoende mobilisering av kalcium i trombocyterna, utan att påverka någon av de andra testade agonisterna (13). APAC hämmade den koncentrationsberoende trombocytadhesionen från helblod till kollagen/TF-yltor under förhållanden motsvarande skjuvhastigheten i arteriellt blod. Dessutom hämmades fibrinbildningen också under venösa skjuvhastighetsförhållanden. Särskilt när APAC (10 µg/ml) var den enda antikoagulansen inhiberades avlagringen av både trombocyter och fibrin till största delen under arteriella skjuvhastighetsförhållanden.

APAC inducerade kraftig fosforylering av tyrosinfosfataserna Shp1 (pTyr562) och Shp2 (p-Tyr580 och p-Tyr542) i humana trombocyter relaterade till G6b-B vid tiofalt lägre koncentration än UFH (15). Mekanismen för hur aktiveringen hämmades var anhopning av trombocyternas ytreceptorer. APAC (10 µg/ml), men inte UFH, hämmar signifikant degranulering av trombocyter av vildtyp som svar på CLEC-2, men inte degranulering av mustrombocyter med avsaknad av G6bB.

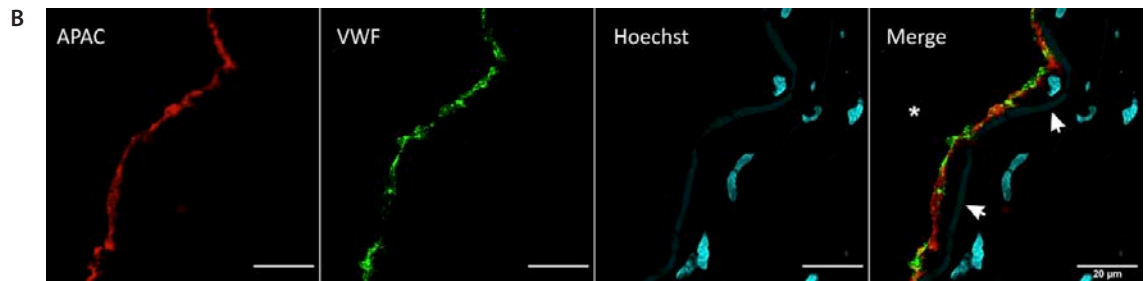
APAC:s antitrombotiska effekter *in vivo*

I en modell för arteriell trombos hos babianer hämmade lokalt applicerad APAC (2 mg), men inte UFH, ocklusion hos 7 av 9 djur med upp till 90-procentig stenosis på ställen med kärlskada (11). Vid en annan trombosmodell i babianer minskade APAC-behandling ($n=4$) trombocytavlagringen på ett kollagen-transplantat med 34 ± 13 procent (medeltal \pm SD) jämfört med UFH ($p=0,01$), medan tillväxten av tromben 10 cm distalt minskades med 63 ± 11 procent jämfört med UFH. På APAC-behandlade ytor ansamlades också 45 procent mindre fibrin än på UFH-behandlade ytor, vilket överensstämmer med APAC:s dubbelverkan ($p=0,008$).

I en musmodell av trombos inducerad av endotelspecifik fotokemisk skada i a. carotis communis förlängde iv APAC (0,3 mg/kg) tiden till artäroklusion till det dubbla jämfört med UFH ($n=8$, $p=0,0001$) (Bonetti *et al.*, *inlämnad*). Dessutom visades i en annan modell av kollageninducerad trombos hos möss att koksaltkontrollerna ansamlade signifikant



Figur 2. APAC målsöker ställen med kärlskada *in vivo*. APAC-biotinbindning till ställen med kärlskada i a. iliaca communis som avskalats med ballong studerades *in vivo* på svin (14). Efter skadan gavs antingen vehikel (fosfatbuffrad koksaltlösning, PBS) eller APAC (1,5 mg) med kateter. Metakromatiskt toluidinblått (ljusrött) färgade de negativt laddade sektionerna p.g.a. närvaro av APAC (A). APAC påvisades med streptavidin (rött), vWF med immunfärgning (grönt) och cellkärnorna med Hoechst 33342 (ljusblått) (B). vWF lokaliserades tillsammans med APAC på lumen-sidan. Pilar: lamina elastica interna visar svag immunfluorescens. Asterisk: lumen. Skala: 20 μ m. (se vidare ref. 14).



fler trombocyter ($n=6$, $p<0.05$) än iv APAC (0,5 mg/kg; $n=6$), vilket tyder på en stark målinriktad lokal inhibitorisk effekt.

Hemostatisk effekt av APAC på svansblödningstid hos råttor

I en modell där svansblödningstiden hos råttor mättes förlängde iv APAC (upp till 0,5 mg/kg; $n=6$) blödningen från ett standardsår maximalt 2,7-falt jämfört med koksaltlösning (11). Jämförbart UFH (0,5 mg/kg; $n=6$) förlängde å sin sida blödningstiden minst det femdubbla gånger, dubbelt upp mot APAC. Också APTT förlängdes dosberoende av APAC och UFH (specifikt vid 0,5 mg/kg). Antalet blodkroppar förändrades inte.

APAC:s vaskulärt målsökande effekter

I modellen med anastomos i a. femoralis hos råttor användes ^{64}Cu -märkt APAC (1,5 mg/kg) som lokaliserades och målsökte till adventitia på skadestället, där det blev kvar i över 50 timmar medan ^{64}Cu -UHF försvann inom 24 timmar (11). APAC eliminerades via njurarna och levern inom 6–12 timmar; 10 procent av intravaskulärt applicerad ^{64}Cu -märkt APAC

påvisades efter 0,5 timmar och 4,5 procent efter upp till 18 timmar.

I svinmodellen med AVF och ballongskadad a. carotis eller iliaca målsökte biotinylerad APAC (0,25–0,3 mg och 1,5 mg) sig till lamina elastica (figur 2) (14). APAC lokaliserades tillsammans med vWF (figur 2 B) och laminin men knappast alls med intakt endotel (PECAM-1 eller podocalyxin). Dessutom genomträngde APAC den skadade kärlväggen, särskilt venen i den arteriovenösa fisteln.

APAC lindrar akut njurskada

I råttmodellen med reversibel akut njurskada (AKI) efter 30 minuters flödesstopp minskade APAC (0,13 mg/kg; $n=8$) den kortikala anhopningen av skademarkören hyaluronan och koncentrationen av KIM-1, vilket tyder på minskad tubulointerstitiell skada jämfört med vehikel ($p<0,05$) (12). De vehikelbehandlade råttorna utvecklade allvarlig tubulusskada. Förbehandling med APAC i koncentrationerna 0,06 och 0,13 mg/kg ($n=8$) minskade det sammanlagda poängtalet för tubulusskada ($p<0,05$). Korrelationen mellan nivån av hyaluronan i njurbarken och poängtalet för tubulusskada var signifikant ($r=0,43$, $p=0,04$).

Antalet blodceller påverkades inte av APAC vid dag 3. I modellen med allvarlig 60 minuters AKI överlevde alla råttorna i APAC-gruppen ($n = 8$) och 75 procent i vehikelgruppen. Vid 24 timmar minskade APAC också serumnivåerna av angiopoetin-2 ($p < 0,05$) och syndekan-1 ($p < 0,01$), som är vaskulärt destabiliserande och proinflammatoriska, jämfört med kontroll. APAC minskade också halten kreatinin ($p < 0,05$) och ureakväve ($p < 0,05$) i blodet. APAC visade ingen fördelaktig verkan om det gavs efter skadan. I motsats till APAC visade UFH ingen skyddande verkan på njurarna.

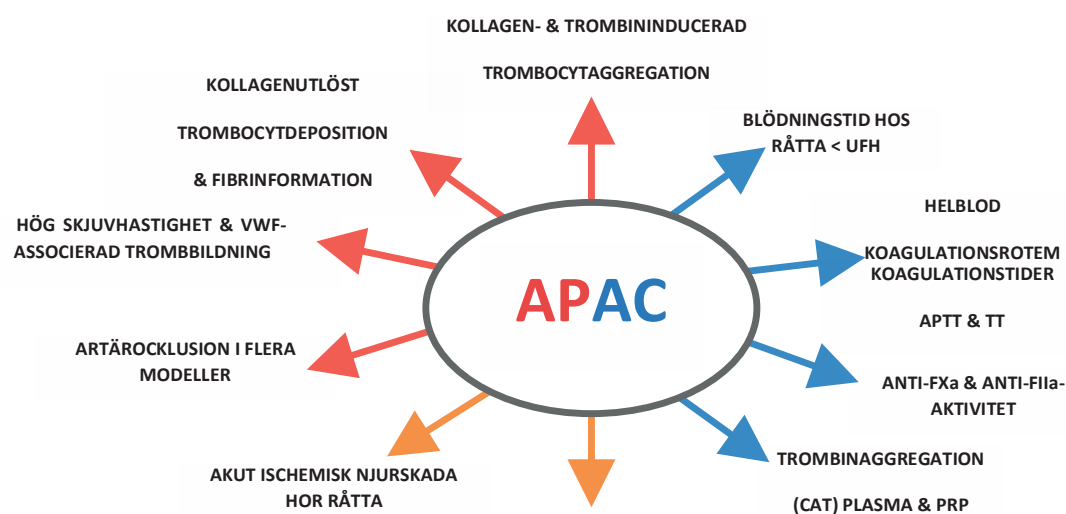
Slutsatser

APAC:s antitrombocytverkan var uppenbar i flera *in vitro*-modeller. APAC hämmade trombocyttaggregation som inducerats av kollagen och ristocetin, men inte ADP, både i PRP och i helblod. Kollagen- och trombinstimulerad kalciummobilisering, som föregick trombocyttsignaleringen, minskade. APAC hämmade fibrinbildning vid venöst blodflöde, och utöver klart minskad fibrinbildning minskade APAC trombocytavlagring under arteriella skjuvkrafter på ytor med kollagen eller vävnadsfaktor. Dessutom minskade APAC, också ensam utan någon annan antikoagulant, trombocytanlagring och fibrinbildning under arteriella skjuvkraftsförhållanden på kraftigt trombogena ytor med kollagen och vävnadsfaktor *in vitro* och kärlytor *in vivo*. Allt som allt var inhiberingen av trombocytavlagring starkast vid arteriella

flödesförhållanden, vilket tyder på att APAC samverkar med vWF. Intressant var att APAC visade en kraftig effekt på signaleringen från den inhibitoriska trombocytreceptorn Gb6-B, vilket tyder på att dess receptoraggregation är en verkningsmekanism för APAC vid kollagenstimulering.

Som antikoagulant förlängde APAC den aktiverade koagulationstiden (APTT) för den interna signalvägen och hämmade effekten av både trombin och FXa i plasma. Den externa TF-utlösta signalvägen hämmades också av APAC i plasma, PRP och helblod. I närvaro av trombocyter och externa stimuli var APAC:s antikoagulationseffekt ännu mer uttalad. På samma sätt inhiberade APAC den externa koagulationsvägen kraftigare än UFH i helblod (ROTEM). I motsats till UFH minskade APAC också trombbildning som svar på extern (TF) stimulering genom att försämrade samverkan mellan trombocyter och fibrin i helblod. APAC:s antikoagulationseffekt var heparinberoende och hindrades av heparinas. Dessa data som utvärderar APAC:s antitrombotiska effekter bekräftar dess dubbeleffekt som antitrombocytmedel och antikoagulant.

Antitrombocyt- och antikoagulationseffekt *in vivo* var uppenbar i studierna med lokalt applicerad APAC vid artärstenos, eftersom modeller med trombocytaktivering och artärtrombos hos babianer visade minskad ocklusion och fibrinbildning vid modellernas skadeställen. När APAC lokaliserades till skadade kärlställen i modellen med kollageninducerad trom-



Figur 3. Översikt över APAC:s karaktäristika APAC:s olika antitrombocyt- (rött) och antikoagulationseffekter (blått). De orangea pilarna visar vaskulära effekter. APTT = aktiverad partiell tromboplastintid, TT = trombintid, TF = vävnadsfaktor, PRP = trombocytrik plasma, CAT = kalibrerat automatiserat trombogram, vWF = von Willebrandfaktor, UFH = ultrafraktionerat heparin

bos hos möss, hämmade substansen arteriell trombos och trombocytansamling. I en annan musmodell *in vivo* fördröjde APAC dessutom kraftigt ocklusion av det trombotiska kärlet jämfört med UFH och vehikel. I modellen med kärlskada hos svin lokaliserades APAC tillsammans med vWF men inte med intakt endotel. I modellen med svansblödningstid hos råttor verkade APAC begränsa trombbildningen genom att samtidigt hämma kollageninducerad trombocyttaggregation och den interna koagulationsvägen. Det är intressant att APAC i en modell med reperfusion efter ischemi hos råttor hade en njurskyddande effekt vid måttlig och till och med kraftig ischemisk njurskada genom att den dämpade kärlskadan och den inneboende immunaktivering.

Generellt sett har denna översikt belyst APAC:s egenskaper i förhållande till UFH. Utgående från sina många unika egenskaper kan APAC utgöra en väsentlig förbättring av den nuvarande antitrombotiska behandlingen. Till dessa egenskaper hör särskilt dubbelverkan med hämning av både trombocytaktivering utlöst av kollagen och trombin samt antikoagulationseffekt och förssämring av trombocyternas koagulationsstärkande effekter. APAC kan potentiellt användas vid många vaskulära ingrepp med risk för trombotiska komplikationer. Eftersom APAC målsöker ställen med kärlskada verkar den kunna lokalisera den antitrombotiska behandlingen till enbart de skadade ställena. Det toxikologiska programmet har genomförts med framgång och den första ansöknings om klinisk prövning har lämnats in till tillståndsmyndigheterna. Kliniska prövningar kommer att visa om det hopp som ställs till APAC kan infrias.

Annikka Jouppila
annukka.jouppila@hus.fi

Inga bindningar

Riitta Lassila
riitta.lassila@hus.fi

Bindningar: Aplagon CSO, Chief Scientific officer

Summary

APAC – a novel vascular injury-targeting multitasking antithrombotic

APAC (AntiPlatelet and AntiCoagulant), a heparin bioconjugate, mimicks natural heparin proteoglycans. APAC inhibits both thrombin and coagulation while showing antiplatelet activity also against collagen, and attenuates arterial thrombosis *in vitro*, and *in vivo*. APAC regulates collagen-mediated platelet activation via platelet receptor G6b-B. APAC's strong interaction with von Willebrand factor abolishes shear-force induced thrombosis in small arteries. In several animal models APAC targets its antithrombotic action to the fresh vascular injury sites. APAC also reverses renal ischemia-reperfusion injury in rats. APAC's toxicology program enables human studies which aim at improving treatment efficacy and safety in various vascular diseases, including revascularisation.

Referenser

1. Eisinger F, Patzelt J, Langer HF. The Platelet Response to Tissue Injury. *Front Med*. 2018;5(317):1-15
2. Harter, K, Levine, M, Henderson, SO. Anticoagulation Drug Therapy: A Review. *West J Emerg Med*. 2015;16(1):11-17
3. Sikorska, J and Uprichard, J, Direct Oral Anticoagulants: A Quick Guide. *Eur Cardiol Rev* 2017;12(1):40-5
4. Fake A, Ranchord A, Harding S, Larsen P. Triple Therapy Versus Dual Antiplatelet Therapy for Patients with Atrial Fibrillation and Acute Coronary Syndromes: A Systematic Literature Review. *Curr Cardiol Rev*. 2017;13(4):325-333
5. Fernandez F, Nguyen P, van Ryn J, Ofosu FA, Hirsh J, Buchanan MR. Hemorrhagic doses of heparin and other glycosaminoglycans induce a platelet defect. *Thromb Res*. 1986;43:491-495
6. Lassila R, Lindstedt K, and Kovanen PT. Native Macromolecular Heparin Proteoglycans Exocytosed From Stimulated Rat Serosal Mast Cells Strongly Inhibit Platelet-Collagen Interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3578-3587
7. Kauhanen P, Kovanen PT, Lassila R. Coimmobilized Native Macromolecular Heparin Proteoglycans Strongly Inhibit Platelet-Collagen Interactions in Flowing Blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:113-119
8. Olsson E, Asko-Seljavaara S, and Lassila R. Topically Administered Macromolecular Heparin Proteoglycans Inhibit Thrombus Growth in Microvascular Anastomoses. *Thromb Haemost* 2002;87: 245-51
9. Wang Y and Kovanen PT. Heparin Proteoglycans Released From Rat Serosal Mast Cells Inhibit Proliferation of Rat Aortic Smooth Muscle Cells in Culture. *Circ Res*. 1999;84:74-83
10. van der Meer JY, Kellenbach E, and van den Bos LJ. From Farm to Pharma: An Overview of Industrial Heparin Manufacturing Methods. *Molecules*. 2017;22(6):1025
11. Lassila, R, and Jouppila, A. Mast cell-derived heparin proteoglycans as a model for a local antithrombotic. *Semin Thromb Haemost* 2014;240: 837-844
12. Tuuminen R, Jouppila A, Salvail D, et al. Dual antiplatelet and anticoagulant APAC prevents experimental ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Clin Exp Nephrol* 2017;21: 436-445
13. Chen J, Verni CC, Jouppila A, Lassila R, and Diamond SL. Dual antiplatelet and anticoagulant (APAC) heparin proteoglycan mimetic with shear dependent effects on platelet collagen binding and thrombin generation. *Thromb Res* 2018; 169: 143-151
14. Barreiro KA, Tulamo RM, Jouppila A, Albäck A, and Lassila R. Novel locally acting dual antiplatelet and anticoagulant APAC targets multiple sites of vascular injury in an experimental model. *EJVES* 2019
15. Vögtle T, Sharma S, Mori J, et al. Heparan sulfates are critical regulators of the inhibitory megakaryocyte-platelet receptor G6b-B. *eLife* 2019; 8: 22 Aug, 46840

Tack

Vi tackar Marja Lemponen för hennes utmärkta tekniska hjälp. Alla våra medarbetare och särskilt Gijs van Dedem, Karina Barreiro, Riikka Tulamo, Anders Albäck, Raimo Tuuminen, Harry Holthöfer, Steven Hanson, Ulla Marzec, Scott Diamond, Jason Chen, Yotis Senis, Timo Vögtle, Brian Cooley, Hansjuerg Beer, Nicole Bonetti, Dan Salvail och Charles Laurent är mycket uppskattade. Vi tackar Stiftelsen för Hjärtforskning och Aarne Koskelos Stiftelse för ekonomiskt stöd.